

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. G. Wendt

Ein neues Kriterium zur Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III: Die Apoprotein E-III-Defizienz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MICHAEL JAESCHKE

aus Darmstadt

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. G. Wendt

Ein neues Kriterium zur Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III: Die Apoprotein E-III-Defizienz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MICHAEL JAESCHKE

aus Darmstadt

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 16.12.1977
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Professor Dr. med. Neurath
Referent: Dr. med. Utermann
Correferent: Professor Dr. med. Wendt



Inhalt

A) E i n l e i t u n g

I. Klassifikation der Hyperlipoproteinämien

II. Die familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III

B) H a u p t t e i l

I. Zielsetzung und Programm der eigenen
Untersuchungen

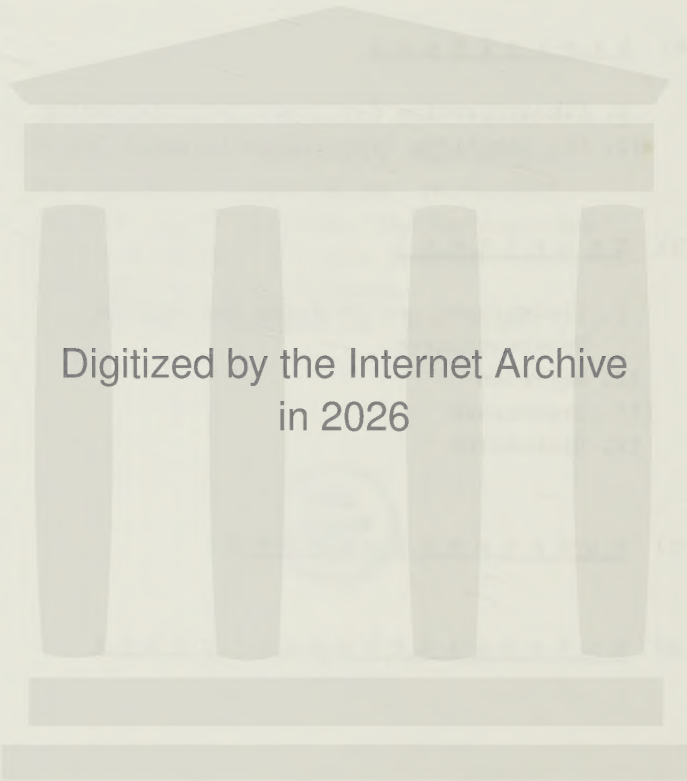
II. Methoden

III. Ergebnisse

IV. Diskussion

C) Z u s a m m e n f a s s u n g

D) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A) Einleitung

I. Klassifikation der Hyperlipoproteinämien.

Die Zunahme einer oder mehrerer Blutfettfraktionen über einen physiologischen Grenzbereich hinaus wird nach neuerer Auffassung als Hyperlipoproteinämie bezeichnet, da die Plasmalipide an Eiweißkörper gebunden als Lipoproteine transportiert werden, d.h. als makromolekulare Komplexe mit spezifischen Proteinen, den Apolipoproteinen (1).

Dabei sind primäre, familiäre und sekundäre, nicht genetisch determinierte Formen der Hyperlipoproteinämien zu unterscheiden. Letztere treten vor allem bei Diabetes mellitus, Hypothyreosen und Nephrosen, aber auch bei chronischem Alkoholabusus und Östrogentherapie auf (9).

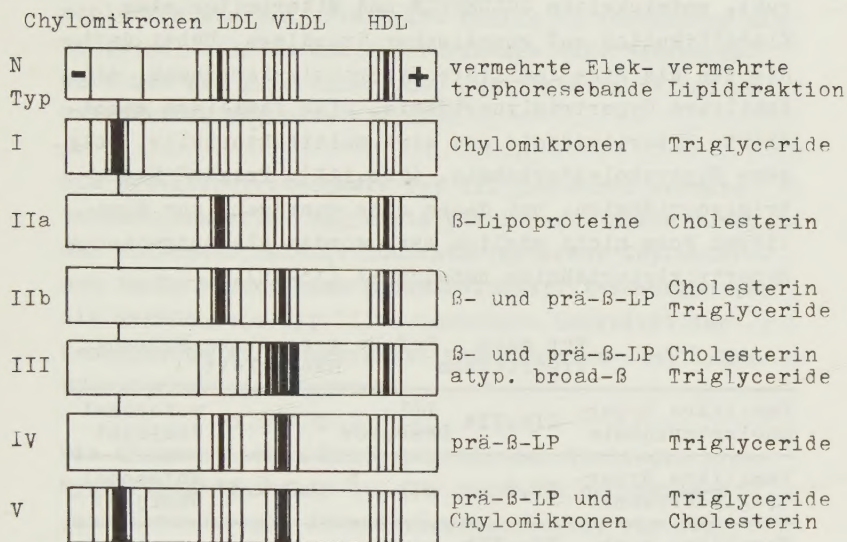
Die chemischen Eigenschaften der Serumlipoproteine und ihr physikochemisches Verhalten erlauben eine Differenzierung in verschiedene Fraktionen mit Hilfe der Ultrazentrifugation, der Elektrophorese und durch immunologische Methoden. Eine Übersicht der Hauptlipoproteinklassen des normolipämischen Humanserums gibt Tab. I.

1954 fanden GOFMAN und Mitarbeiter (12) nach analytischer Ultrazentrifugation bestimmte spezifische Lipoproteinemuster, die eine Differenzierung verschiedener Hyperlipidämieformen ermöglichten.

	überwiegende Apoproteine	überwiegender Lipidanteil	Ultra- zentrifuge	Elektro- phorese
Chylo- mikronen	ApoC ApoB	exogene TG	d 0.95g/ml S _f 400	Start, keine Wanderung
VLDL	ApoC ApoB ApoE	endogene TG	d=0.95- 1.006g/ml S _f 20-400	prä- β (α_2)
LDL ₁	ApoB ApoE ApoC	TG Cholesterin	d=1.006- 1.019g/ml S _f 12-20	zwischen prä- β u. β
LDL ₂	ApoB	Cholesterin	d=1.019- 1.063g/ml S _f 0-12	β
HDL	ApoA	Phospholipide Cholesterin	d=1.063- 1.21g/ml	α_1
VLDL : Verylow-density lipoproteins LDL : Low-density lipoproteins HDL : High-density lipoproteins				

Tab. I: Hauptlipoproteinklassen des Humanserums.

Eine praktikable Einteilung der primären Hyperlipoproteinämien in Typen I-V wurde von FREDRICKSON und LEES empfohlen. Diese folgt phänomenologischen Kriterien, d.h. sie ist deskriptiv ausgerichtet, indem sie sich vor allem auf die Verteilungsmuster in der Elektrophorese stützt (8,9). Tab.II verdeutlicht diese klassische Einteilung der Hyperlipoproteinämien, die in Richtung ihrer Wanderung im elektrischen Feld bezeichnet werden.



Tab. II: Elektrophoresemuster der primären Hyperlipoproteinämien nach FREDRICKSON und LEES.

Typ I bezeichnet die Vermehrung der Chylomikronen an der Auftragsstelle, Typ IIa die Vermehrung der in β -Position wandernden Lipoproteine, bei zusätzlicher Vermehrung der prä- β -Lipoproteine spricht man vom Typ IIb. Die zunehmende Verschmelzung dieser beiden Elektrophoresebanden ist charakteristisch für Typ III. Kennzeichnend für Typ IV ist die isolierte prä- β -Zunahme. Typ V bezeichnet die gleichzeitige Vermehrung der prä- β -Lipoproteine und Chylomikronen.

Während die sog. klassische Einteilung der Hyperlipoproteinämien demnach auf phänotypischen Kriterien be-

ruht, entwickelten GOLDSTEIN und Mitarbeiter eine Klassifikation auf genetischer Grundlage. Dabei definierten sie eine familiäre Hypercholesterinämie, eine familiäre Hypertriglyceridämie, eine familiäre kombinierte Hyperlipidämie und eine multifaktorielle, polygene Hypercholesterinämie. (Tab.III). Primäre Hypertriglyceridämien, bei denen eine Zuordnung zur familiären Form nicht möglich war, wurden als sporadische Hypertriglyceridämien bezeichnet (13-15).

	Typ nach Fredrickson	Defekt	geschätzte Häufigkeit	Erbgang
Familiäre Hypercholesterinämie	IIa,IIb	LDL-Rezeptor	0.1-0.2%	autosomal dominant
Familiäre Hypertriglyceridämie	IV,V	n.b.	0.2-0.3%	autosomal dominant
Familiäre komb. Hyperlipidämie	IIa,IIb IV,V	n.b.	0.3-0.5%	autosomal dominant
Broad-B Disease	III	n.b.	0.01-0.04%	unklar
Hyperlipoproteinämie Typ I	I	LPL	selten	autosomal rezessiv
Polygene Hypercholesterinämie	IIa,IIb	n.b.	n.b.	polygen

Tab. III: Familiäre Hyperlipoproteinämien. Genetische Einteilung - modifiziert nach GOLDSTEIN et al. (15).

II. Die familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III.

Die Hyperlipoproteinämie Typ III ist klinisch gekennzeichnet durch Xanthome - insbesondere an Knien, Ellenbogen und Handinnenflächen - sowie durch ein frühzeitiges Auftreten von coronaren und peripheren Ver-

schlußkrankheiten. Sie tritt häufig in Verbindung mit Diabetes mellitus und Hyperurikämie auf. Bemerkenswert ist das gute Ansprechen auf diätetische und medikamentöse Therapie (26,47).

Die Hyperlipoproteinämie Typ III ist durch erhöhte Serumcholesterin- und -triglyceridwerte sowie durch das Auftreten relativ cholesterinreicher Chylomikronen im Nüchternplasma gekennzeichnet. Anzumerken ist die gerade beim Typ III ausgeprägte Labilität der Serumlipide in Abhängigkeit vom Kalorien- und Kohlenhydratgehalt der Nahrung.

Die diagnostischen Kriterien für das Vorliegen einer Hyperlipoproteinämie Typ III haben in den letzten Jahren wiederholt Abwandlungen erfahren, was die Schwierigkeiten der Abgrenzung gegenüber anderen Hyperlipoproteinämieformen aufzeigt.

Eine erste Differenzierung gegenüber anderen Hyperlipoproteinämien lieferten GOFMAN und Mitarbeiter (12) mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation: bei Patienten mit Xanthoma tuberosum zeigten sich erhöhte Lipoproteinkonzentrationen mit Flotationskonstanten von S_f 20-400 und S_f 12-20, im Bereich S_f 0-12 dagegen erniedrigte Lipoproteinkonzentrationen (vgl. Tab. I).

Als spezifisches diagnostisches Kriterium galt bis vor kurzem der Nachweis eines atypischen Lipoproteins in der VLDL-Fraktion betroffener Individuen, das β - statt der normalen prä- β -Mobilität in der Elektro-

phorese zeigt und aufgrund dieses elektrophoretischen Verhaltens als β -VLDL, aufgrund seines Flotationsverhaltens bei der Ultrazentrifugation auch als "floating β -lipoprotein" bezeichnet wird (10). Es enthält mehr Cholesterin und weniger Triglycerid in Relation zum Proteingehalt als normale VLDL. Daneben findet sich auch bei Typ III - Patienten das α_2 - oder prä- β -Lipoprotein, das im Lipid- und Proteingehalt und in seinem physikalischen Verhalten den VLDL normaler Individuen entspricht (35). Das gemeinsame Auftreten dieser beiden Lipoproteine imponiert in der Lipidelektrophorese häufig als breite β -Bande, weshalb die Erkrankung auch als "broad- β -disease" bezeichnet wird. Diese breite β -Bande kann aber beim Typ III durchaus fehlen oder umgekehrt bei anderen Hyperlipoproteinämieformen - Typ IIb, IV, V - auftreten (24).

Die als β -VLDL imponierende Subfraktion entspricht einem Dichtebereich der Flotationskonstanten S_f 20-60, während der Bereich S_f 60-400 die prä- β -Lipoproteine repräsentiert (19).

Die Anhäufung der β -VLDL bei der Broad- β Disease soll auf einer Blockade des normalen Abbauweges der prä- β -Lipoproteine zu LDL_2 auf der Stufe der LDL_1 beruhen (4). Im Verlauf der physiologischen Abbaus der Plasmalipoproteine kommt es zur Abspaltung von Triglyceriden, Phospholipiden und Proteinen und zur Anhäufung von Cholesterinestern mit entsprechenden Veränderungen elektrischer Ladungen und elektrophoretischer Mobilität. Die langsamere Mobilität der akkumulierenden β -VLDL in der Elektrophorese wird auf einen Verlust der C-Proteine bei ansteigenden Konzentrationen von "arginine-rich peptide" (ApoE) zurückgeführt (18).

Die β -VLDL werden damit als physiologische "intermediates" oder "remnants" des normalen Plasmalipoproteinkatabolismus aufgefaßt, deren unphysiologische Anhäufung bei der Hyperlipoproteinämie Typ III sie für qualitative Nachweismethoden erst faßbar macht (24).

Die Schwierigkeiten der Abgrenzung der Hyperlipoproteinämie Typ III von anderen Formen mit Hilfe des β -VLDL-Nachweises werden vor allem durch die Arbeiten von HAZZARD und Mitarbeitern aufgezeigt (23,24). Danach ist das Auftreten der β -VLDL keineswegs spezifisch für die familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III. Der Nachweis bei der familiären Hypertriglyceridämie (Typ IV) scheint allein von geeigneten, ausreichend sensitiven elektrophoretischen Methoden abhängig zu sein.

Zudem variiert das Verhältnis α_2 : β -VLDL bei beiden Hyperlipoproteinämieformen in Abhängigkeit von diätetischen und medikamentösen Bedingungen: bei verminderter Triglycerid-Synthese (Fasten) oder beschleunigter Lipolyse (nach Heparin-Gabe) zeigen familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III und Hypertriglyceridämie (Typ IV) eine β -VLDL-Vermehrung. Beim Typ III bedingt eine ansteigende Triglyceridsynthese (KH-reiche Diät) eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der α_2 -VLDL (35); HAZZARD beobachtet unter dieser Bedingung eine gleichzeitige Zunahme beider Komponenten (24).

Nach Verabreichung von Clofibrat zeigt sich bei Typ III - Patienten eine relative Abnahme der schnell-

ler wandernden, triglyceridreichen Komponente zugunsten der langsameren cholesterinreicheren β -VLDL.

Aufgrund der unzureichenden Spezifität des β -VLDL-Nachweises wurden zur Abgrenzung der Broad- β Disease gegenüber anderen Hyperlipoproteinämien quantitativ-chemische Kriterien herangezogen.

HAZZARD gab als diagnostisches Kriterium ein Cholesterin-Triglycerid-Verhältnis von > 0.42 in der VLDL-Fraktion an. Die Bestimmung dieses Quotienten war jedoch bei normotriglyceridämischen Individuen nicht sicher verwertbar und sollte daher nur zur Abgrenzung von anderen Hypertriglyceridämieformen herangezogen werden (21). Nach neueren Untersuchungen wird die Broad- β Disease mit Hilfe dieses lipidchemischen Kriteriums nicht mit Sicherheit erfaßt (25, 40).

FREDRICKSON und Mitarbeiter postulierten bei Plasma-triglyceridwerten zwischen 150 und 1000 mg/100 ml ein Verhältnis von VLDL-Cholesterin zu Plasmatriglyceriden > 0.30 als charakteristisch für die Hyperlipoproteinämie Typ III (11).

Die der familiären Hyperlipoproteinämie Typ III zugrundeliegende Störung ist noch nicht bekannt. Der Vererbungsmodus ist umstritten. Postuliert werden ein autosomal-dominanter (25,33), ein autosomal-rezessiver (10), ein gemischt-heterozygoter (31) sowie ein polygener Erbgang (32).

Den konstanten Apoproteinanteil der normalen VLDL bilden die Apoproteine B und C. Als weiterer Bestandteil wurde das Apoprotein E beschrieben (41), das dem "arginine-rich peptide" von SHORE und SHORE (38) ent-

spricht (Tav.I). Dieses Apoprotein E, dessen biologische Funktion noch unbekannt ist, liegt in den β -VLDL von Typ III - Patienten in weitaus höherer Konzentration vor (18,42).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit gelang es, ein spezifisches qualitatives Kriterium zur Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III zu entwickeln: die ApoE_{III}-Defizienz, d.h. das Fehlen einer Proteinkomponente des polymorphen Apoprotein E. Dieser spezifische "marker" erlaubt erstmals eine exakte Abgrenzung von allen anderen Hyperlipoproteinämieformen.

B) H a u p t t e i l

I. Zielsetzung und Programm der eigenen Untersuchungen.

Der der Broad- β Disease zugrundeliegende Defekt ist nicht bekannt. Eine sichere Abgrenzung gegenüber anderen Hyperlipoproteinämieformen ist mit den bisher bekannten Methoden nicht möglich. Aufgrund des Fehlens zuverlässiger Kriterien zur Diagnostik der Hyperlipoproteinämie Typ III wurde in der vorliegenden Arbeit nach einem spezifischen "marker" dieser familiären Stoffwechselstörung gesucht. Als Ansatz boten sich Untersuchungen am Apoprotein E an. Dieses repräsentiert etwa 18% der harnstofflöslichen und 10% der gesamten Apo-VLDL normolipämischer Individuen. Bei Typ III - Patienten tritt es dagegen mit einem Anteil von ca.57% der harnstofflöslichen

Apo-VLDL in deutlich höherer Konzentration auf (18, 42, 44). Die Anreicherung des Apoproteins E in der VLDL-Fraktion betroffener Individuen weist auf eine besondere Rolle im pathophysiologischen Geschehen der familiären Hyperlipoproteinämie Typ III hin.

Das argininreiche Apoprotein E mit einem Molekulargewicht von 39 000 in der SDS-PAGE (s.u.) tritt in 3 polymorphen Formen auf (37, 38, 41), die als ApoE-I, ApoE-II und ApoE-III bezeichnet werden.

Die ApoE-Polypeptidkomposition wurde mit Hilfe unten aufgeführter Fokussiermethoden bei Typ III - Patienten sowie bei normo- und hyperlipämischen Kontrollen analysiert.

Sich anschließende Familienuntersuchungen, bei denen die Hyperlipoproteinämie Typ III aufgrund des entwickelten ApoE-"markers" und klassischer Kriterien von anderen Formen abgegrenzt wurde, sollten Aufschluß über den Vererbungsmodus dieser familiären Stoffwechselstörung geben.

II. Methoden

Probanden

Untersucht wurden zunächst 8 nicht verwandte Typ III - Patienten, 30 normolipämische und 19 hyperlipämische Individuen, von denen aufgrund lipidchemischer und elektrophoretischer Kriterien 8 der Hyperlipoproteinämie Typ II und 11 Typ IV zugeordnet werden konnten. Von den Broad- β -Disease - Patienten standen zur Zeit der Untersuchung H.S. unter medi-

kamentöser, A.S. unter diätetischer lipidsenkender Therapie (Tab. IV).

Pat.	A/G	Lp- Muster	C - Serum	TG - Serum	$\frac{C-VLDL}{TG-VLDL}$	$\frac{C-VLDL}{TG-Ser}$	Klinik
			—mg/100ml—		(r)		
E.M. 64/F		III	628	834	0.66	0.52	Herzinfarkt, periphere Gefäßkrankheit
E.R. 39/M		III	336	560	0.49	0.31	Xanthome an Knien und Ellenbogen
A.S. 29/M		III	176	272	0.29		Xanthome
E.T. 42/M		III	479	467	0.64	0.53	Herzinfarkt
H.S. 44/M		III	290	251	0.67		
S.J. 60/F		III	630	816	0.77	0.66	Herzinfarkt, periphere Gefäßkrankheit, Xanthome, Diabetes
H.S. [†] 67/M		III	226	220	1.1	0.27	Herzinfarkt
M.B. 59/M		III	613	366	0.84	0.66	Herzinfarkt, periphere Gefäßkrankheit, Xanthome, Diabetes
C.B. 67/F		III	374	609	0.53	0.38	Herzinfarkt, Diabetes

[†]unter Therapie mit Clofibrat ; A = Alter ; G = Geschlecht

Tab. IV: Klinische und laborchemische Daten untersuchter Typ III- Patienten.

Die Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III beruhte auf den oben ausgeführten Kriterien: erhöhte Serumcholesterin- und Triglyceridwerte, dem Verhältnis C/TG der VLDL > 0.42 und $r (= C-VLDL/Serumtriglyceride) > 0.30$, sowie auf dem β -VLDL- Nachweis in der Agarose-Gelelektrophorese. Eine Zusammenstellung der klinischen und laborchemischen Daten der untersuchten Typ III- Patienten zeigt Tab. IV.

4 der Typ III- Patienten (E.M., E.R., A.S., E.T.) dienten als Ausgangspunkt sich anschließender Familienuntersuchungen. In deren Verlauf wurden die Serumlipoproteine von insgesamt 60 Familienmitgliedern analysiert.

Die Bestimmung der Serumlipide erfolgte bei folgenden Individuen unter medikamentöser Beeinflussung:

S-I₁₃ (Familie S.) und T-I₃ (Familie T.) wurden wegen Diabetes mellitus mit oralen Antidiabetika behandelt. S-II₄ (Familie S.) stand bis 2 Monate vor der Untersuchung wegen bestehender Hyperthyreose unter Novothyral- Behandlung und nahm zur Zeit der Untersuchung östrogenhaltige Ovulationshemmer ein.

Analytische Methoden

Mit Hilfe einer Laborzentrifuge gewonnenes Nüchternserum wurde 1 - 2 Stunden nach Blutentnahme bei +4° C aufbewahrt und innerhalb der nächsten 48 Stunden aufgearbeitet.

Präparation der Lipoproteine und Apoproteine.

Aus den Nativseren der Salzdichte $d = 1.006$ g/ml erfolgte die Fraktionierung in VLDL, LDL und HDL durch stufenweise Ultrazentrifugation mit Hilfe von Salzlösungen der Dichten 1.006, 1.063 und 1.21 g/ml nach der Methode von HAVEL et al. (17). Diese wurde mit dem "Spinco model L₂-65 B" bei 39 000 RPM und einer Temperatur von 4° C für 22 Std. durchgeführt.

Die Delipidifizierung erfolgte durch mehrere Extraktionen in Aceton-Äthanol 1:1 (v/v) bei -15° C in einem Verhältnis von 1:20. Nach Abzentrifugieren in der La-

borzentrifuge bei -15°C wurde der Überstand verworfen, der Unterstand mit dem festen Apoproteinanteil getrocknet.

Elektrophoretische Methoden.

Die SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamid gel-electrophoresis), die eine Trennung der Apoproteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht, wurde mit 10%igen Acrylamidgelen nach der Methode von WEPER und OSPORNE (45) durchgeführt.

Die Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte auf 9×12 cm großen Glasplatten nach der Methode von VAN MEUSEN et al. (29). Dabei wurde phänomenologisch sowohl die durchgehende VLDL-Bande von β - bis prä- β -Mobilität als auch die zusätzliche VLDL-Bande in β -Position als Typ III - Muster interpretiert (Abb. 1).

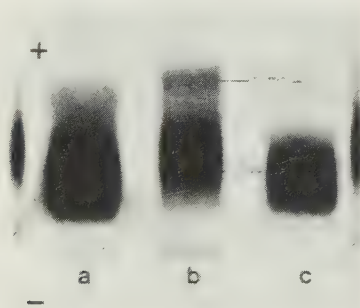


Abb.1: Agarose-Gel-Elektrophorese von Serum (a), VLDL (b) und Lipoproteinfraktionen $> 1.006 \text{ g/ml}$ (c) bei Typ III - Patient H.S. unter Clofibrattherapie.

Die analytische isoelektrische Fokussierung wurde nach der Methode von WRIGLEY (46) modifiziert. Die Polyacrylamidgele enthielten 7.5% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid, 8M Harnstoff sowie Ampholine pH 3.5 - 10 (LKB-Producter, Bromma, Schweden). Die Fokussierung wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ und konstanter Spannung von 150 Volt über 16 Std. durchgeführt. Die Proteine wurden mit 5% Trichloressigsäure und 5% Sulfosalicylsäure für 2 Std. fixiert.

Nach Anfärbung der Fokussiergele mit "Coomassie brilliant blue" war es mit Hilfe der Densitometrie am Vitatron TLD möglich, quantitative Bestimmungen der Apoproteine C und E anhand standardisierter Vergleichskurven vorzunehmen. Zudem gab die Densitometrie wichtigen Aufschluß über die prozentuale Verteilung der ApoE- Subfraktionen.

Weitere analytische Methoden.

Der Triglyceridgehalt in Humanserum und Lipoproteinen wurde nach der Methode von EGGSTFIN und KREUTZ (7), die Cholesterinkonzentration in Serum und Lipoproteinfraktionen nach ROESCHLAU et al. (36) bestimmt.

Triglyceridwerte über 150 mg/100ml und Cholesterinwerte im Serum über 200 mg/100ml + Lebensalter werden im folgenden nach dem Vorschlag FREDRICKSON's (26) als Hyperlipidämie bezeichnet.

Der Cholesteringehalt der VLDL wird in der vorliegenden Arbeit als Mittel aus direkter und indirekter Bestimmung angegeben. Bei der indirekten Bestimmung errechnet sich die Cholesterinkonzentration der VLDL wie folgt: $\text{C-VLDL} = \text{Serumcholesterin} - \text{C} > 1.006$.

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von LOWRY (27) mit 0.1% SDS im Reaktionsgemisch durchgeführt.

III. Ergebnisse

Analyse der ApoE-Polypeptide bei normo- und hyperlipämischen Kontrollen.

Wie oben ausgeführt finden sich als Hauptproteinkomponenten der VLDL normolipämischer Individuen die Apoproteine B, C und E (Tab. 1). Zur Entwicklung geeigneter Darstellungsmethoden wurde zunächst das

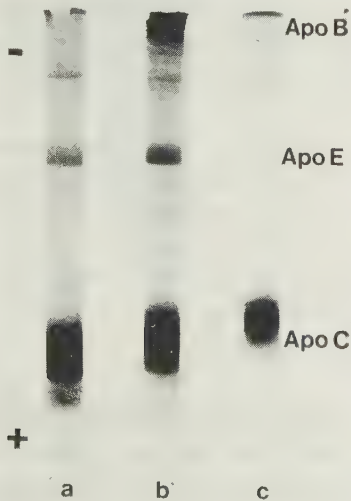


Abb. 2 : SDS-PAGE von Apo-VLDL aufgenommen in Äthylmorpholin-HCl pH 8.6. a. 8M an Harnstoff b. 2% SDS. In a. sind die Apoproteine C und E, in b. B,C und E und in c. - reiner Äthylmorpholinpuffer - Apoprotein C löslich.

Lösungsverhalten dieser Apoproteine in verschiedenen Medien mit Hilfe der analytischen SDS-PAGE nach WEBER und OSBORNE (45) studiert. Die nach Extraktion in Aceton-Äthanol gewonnenen Apo-VLDL wurden in gleichen Teilen aufgenommen in :

- a. Äthylmorpholin- HCl pH 8.6, 8M an Harnstoff,
- b. Äthylmorpholin- HCl pH 8.6, 2% SDS, sowie in
- c. Äthylmorpholin- HCl pH 8.6.

Das Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese, die auf der Trennung der Apoproteine nach ihrem Molekulargewicht beruht, zeigt Abb. 2. Danach wird Apoprotein E nur in Anwesenheit von SDS oder Harnstoff gelöst.

Die Darstellung der ApoE- Polypeptidkomposition in der analytischen Fokussierung erfolgte daher in Gegenwart von Harnstoff. Das charakteristische Fokussiermuster der harnstofflöslichen Apo-VLDL normo- und hyperlipämischer Individuen zeigt Abb. 3.

Qualitativ stellten sich die ApoE-Polypeptide E-I, E-II und E-III in der analytischen, isoelektrischen Fokussierung aller 49 Kontrollen in gleicher Weise dar. Bei 5 der 19 hyperlipämischen (26%), bei 10 der 30 normolipämischen Individuen (33%) trat eine zusätzliche ApoE-Polypeptidkomponente in Erscheinung, die als ApoE-IV bezeichnet wurde.

Quantitativ konnte bei über 70% der Kontrollen mit Hilfe der Densitometrie der mit "Coomassie brilliant blue" angefärbten Fokussiergele ein Verhältnis ApoE-II: E-III von annähernd 0.5 bestimmt werden. Dieses Fokussiermuster wird im Verlauf als ApoE-N bezeichnet. Bei 14 Kontrollen war das Verhältnis ApoE-II:E-III

zugunsten des ApoE-II-Polypeptids verschoben. Wir werden unten ausführlicher auf diese Variante eingehen, die im folgenden als Phänotyp ApoE-ND bezeichnet wird. Quantitativ repräsentierte ApoE in einem Pool von 12 normolipämischen Kontrollen 18% der harnstofflöslichen Apo-VLDL. (Tab. V).

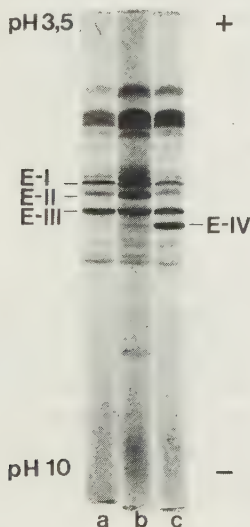


Abb. 3: Analytische, isoelektrische Fokussierung der harnstofflöslichen Apo-VLDL bei pH 3.5-10.

- a. ApoE-N-Phänotyp mit einem ApoE-II/E-III- Verhältnis von etwa 0.5
- b. ApoE-ND-Phänotyp - ApoE-II:E-III ca. 1
- c. ApoE-N- Phänotyp mit ApoE-IV (ApoE-N E-IV+)

Analyse der ApoE-Polypeptide bei Typ III- Patienten.

Bei keinem der untersuchten Typ III- Patienten konnte die ApoE-Komposition normo- und hyperlipämischer Kontrollen nachgewiesen werden. Die Abweichungen betrafen

zum einen den prozentualen ApoE-Anteil an der harnstofflöslichen VLDL-Fraktion, zum andern das Verhältnis der einzelnen ApoE-Polypeptidkomponenten untereinander.

Die SDS-PAGE der VLDL von Broad- β Disease- Patienten ergab zwar qualitativ die in Abb. 2 aufgezeigte Apo-VLDL-Komposition normolipämischer Individuen. Quantitativ konnte jedoch mit Hilfe der Densitometrie eine Abnahme der ApoC-Polypeptide in der harnstofflöslichen VLDL-Fraktion nachgewiesen werden. Der relative ApoE-Anteil betrug hier etwa 52% und lag damit deutlich höher als bei normolipämischen Kontrollen (Tab. V).

Das entscheidende Kriterium aber betraf das qualitative ApoE-Muster in der analytischen, isoelektrischen Fokussierung. Trotz zunehmender ApoE-Konzentrationen fehlte das bei allen normo- und hyperlipämischen Individuen auftretende ApoE-III-Polypeptid bei Typ III-Patienten. Der Phänotyp dieser ApoE-III-Defizienz in der analytischen Fokussierung wurde als ApoE-D bezeichnet (Abb. 4).

Im Zusammenhang mit der ApoE-III-Defizienz trat bei allen untersuchten Broad- β Disease- Patienten eine betonte ApoE-II- Bande in der Fokussierung auf, die quantitativ mit Hilfe der Densitometrie erfaßt wurde (Tab. V).

Eine Darstellung der densitometrisch erfaßten Phänotypen ApoE-N, ApoE-ND und ApoE-D gibt Abb.5.

Patient	ApoC	ApoE	E-I	E-II	E-III	Phänotyp
E.M.	44	56	42	58	0	ApoE-D
E.R.	27	73	41	59	0	ApoE-D
A.S.						ApoE-D
E.T.	58.3	41.7	53.3	46.7	0	ApoE-D
H.S.	60	40	42	58	0	ApoE-D
S.J.	45	55	42	58	0	ApoE-D
H.S.	56	44	51.1	48.9	0	ApoE-D
M.B.	45.2	54.8	59.8	40.2	0	ApoE-D
C.B.						ApoE-D
Durchschnitt	48	52	47.3	52.7	0	
Kontrollpool +	82	18	38	23	39	ApoE-N

+ = VLDL-Pool 12 normolipämischer Individuen

Tab. V: Apoprotein-Komposition der harnstofflöslichen Apo-VLDL von Typ III-Patienten und normolipämischen Kontrollen.

ApoE-III konnte ebenso wenig in einer der anderen Lipoproteinfraktionen nachgewiesen werden.

Die LDL₁ von Typ III-Patienten enthielt zwar Partikel von β -Mobilität mit hohem ApoE-Gehalt der harnstofflöslichen Fraktion, aber auch hier fehlte das spezifische ApoE-III-Polypeptid.

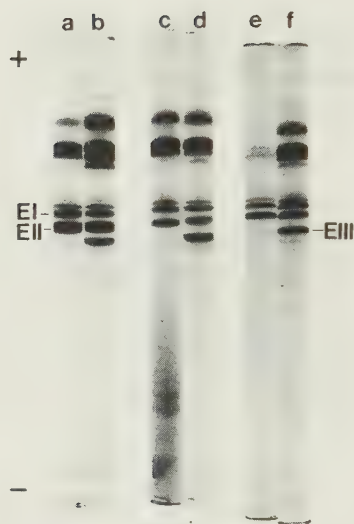


Abb. 4: Analytische isoelektrische Fokussierung der Apo-VLDL in Polyacrylamidgelen bei pH 3.5-10 von Patienten E.M.(a), H.S.(c) und E.R.(e) mit familiärer Hyperlipoproteinämie Typ III, vom Sohn der Typ III-Probandin E.M. mit Hyperlipoproteinämie Typ IV (b) und Kontrollen (d,f).

Die ApoE-III-Defizienz repräsentiert damit ein qualitatives Kriterium zur Diagnose der Broad- β Disease auf Proteinebene.

Mit Hilfe dieses genetischen "markers" sollten Familienuntersuchungen Aufschluß über den Vererbungsmodus der Broad- β Disease geben.

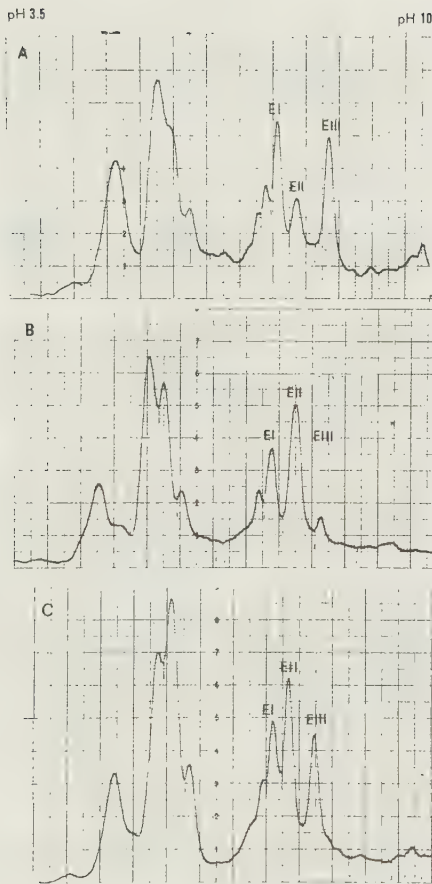


Abb. 5: Densitometrische Darstellung der Phänotypen ApoE-N (A), ApoE-D (B) und ApoE-ND (C).

Familienuntersuchungen

Die Typ III- Probanden, deren Familien untersucht wurden, waren E.M. (Familie M.), E.R. (Familie R.), A.S. (Familie S.) und E.T. (Familie T.) (vgl. Tab. IV-IX, Abb. 6-9).

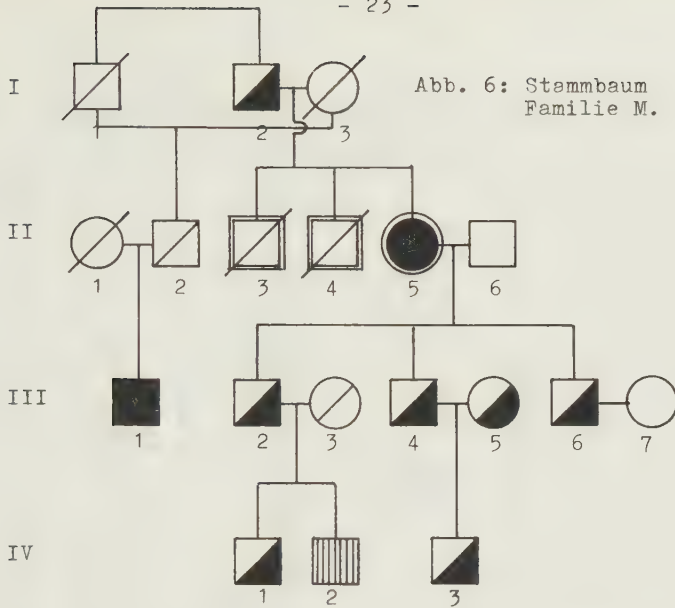
Die Daten aller 60 untersuchten Probanden sind in Tab. VI-IX zusammengestellt (vgl. Abb. 6-9).

ApoE-Phänotypen in Typ III- Familien und genetische Folgerungen.

Wie oben ausgeführt sind bei der analytischen isoelektrischen Fokussierung der harnstofflöslichen Apo-VLDL 3 ApoE-Phänotypen zu unterscheiden: ApoE-N, ApoE-ND und ApoE-D (Abb. 3,4).

ApoE-N war dabei durch ein ApoE-II/E-III- Verhältnis von etwa 0.5, ApoE-D durch das Fehlen des E-III-Polypeptids charakterisiert. Phänotyp ApoE-ND nahm eine "intermediäre" Stellung zwischen den ApoE-N- und ApoE-D- Fokussierungsmustern ein. Dieser intermediäre ApoE-ND-Phänotyp mit betontem E-II-Polypeptid in der analytischen Fokussierung war meist schon inspektorisches deutlich abgrenzbar (Abb. 3). Quantitativ wurde mit Hilfe der Densitometrie ein ApoE-II/E-III-Verhältnis von etwa 1.0 bestimmt (Abb. 5).

Eine Zusammenstellung der untersuchten ApoE-Elternkombinationen und daraus resultierender ApoE-Phänotypen der Folgegeneration gibt Tab. X.



Nr.	A/G	Lp-muster	Cholesterin			TG Ser-	C-VLDL		ApoE-muster
			Ser-	VLDL->1.006	mg/100ml		TG-VLDL	TG-Ser	
I ₂	86/M	N	205	16		115	0.45	0.14	ApoE-ND
II ₅	64/F	III	628	432	151	834	0.66	0.52	ApoE-D
II ₆	66/M	N	252			89			ApoE-N
III ₁	44/M	III	290			251	0.67		ApoE-D
III ₂	43/M	IV	317			514	0.34		ApoE-ND
III ₄	40/M	N	243			116	0.17		ApoE-ND
III ₅	38/M	N	196			95			ApoE-ND
III ₆	35/M	IIa	296			144	0.21		ApoE-ND
III ₇	33/F	N	188	15	160	69	0.28	0.22	ApoE-N
IV ₁	23/M	IV	243			246	0.23		ApoE-ND
IV ₂	20/M	N	240	40	172	167		0.24	ApoE-N ⁺
IV ₃	9/M	N	153			167			ApoE-ND

Tab. VI: Labordaten der Typ III-Familie M. Nr. = Stammbaumnnummer; A = Alter; G = Geschlecht; Ser = Serum; + = ApoE-IV+ (vgl. Abb. 3).

Nr.	A/G	Lp-Muster	Cholesterin			TG	C-VLDL	C-VLDL	ApoE-
			Ser-	VIDL->	>1.006	Ser-	TG-VLDL	TG-Ser	muster
			mg/100ml						(r)
I ₂	65/F	IIa	325			138			ApoE-N
I ₅	58/F	IIa	296	56	220	147		0.39	ApoE-ND ⁺
I ₆	60/M	N	230	27	184	138	0.26	0.20	ApoE-N
I ₇	56/F	N	258	22	228	138		0.16	ApoE-ND ⁺
I ₈	53/M	N	283			243			ApoE-ND ⁺
I ₉	52/F	N	199			136			ApoE-N
I ₁₀	66/M	IIa	324			129	0.41		ApoE-ND
I ₁₁	64/F	IIa	336			64	0.23		ApoE-ND
I ₁₃	66/M	IV	240	45	187	281		0.16	ApoE-ND ⁺
I ₁₄	66/F	N	183	10	172	94		0.11	ApoE-N
II ₁	36/F	N	188			69			ApoE-N
II ₂	41/M	N	143	7	135	83	0.10	0.08	ApoE-N
II ₃	48/M	IIb	560	301	201	849		0.35	ApoE-N ⁺
II ₅	27/M	N	186	10	169	41		0.24	ApoE-N ⁺
II ₆	24/F	N	236	16	213	90		0.18	ApoE-N ⁺
II ₇	30/F	N	198			94			ApoE-N ⁺
II ₈	26/F	N	193			89			ApoE-N ⁺
II ₉	48/M	N	228						ApoE-N
II ₁₀	39/F	IIa	308			89	0.27		ApoE-ND
II ₁₁	39/M	III	336	172	128	560	0.49	0.31	ApoE-D
II ₁₂	37/F	N	212	70	122	129		0.13	ApoE-N
II ₁₃	35/M	IIb	364			214			ApoE-ND
II ₁₄	38/M	N	186	20	155	134		0.15	ApoE-ND
III ₁	12/M	N	220			59	0.31		ApoE-ND
III ₂	10/M	N	201	32	161	116			ApoE-ND

Tab. VII: Labordaten der Typ III-Familie R., Typ III-Patient E.R. unter Stammbaumnummer II₁₁. A = Alter ; G = Geschlecht ; Ser = Serum ; C = Cholesterin ; TG = Triglycerid ; Lp-Muster = Lipoproteinmuster in der Elektrophorese ; + = ApoE-IV+ (Abb.3)

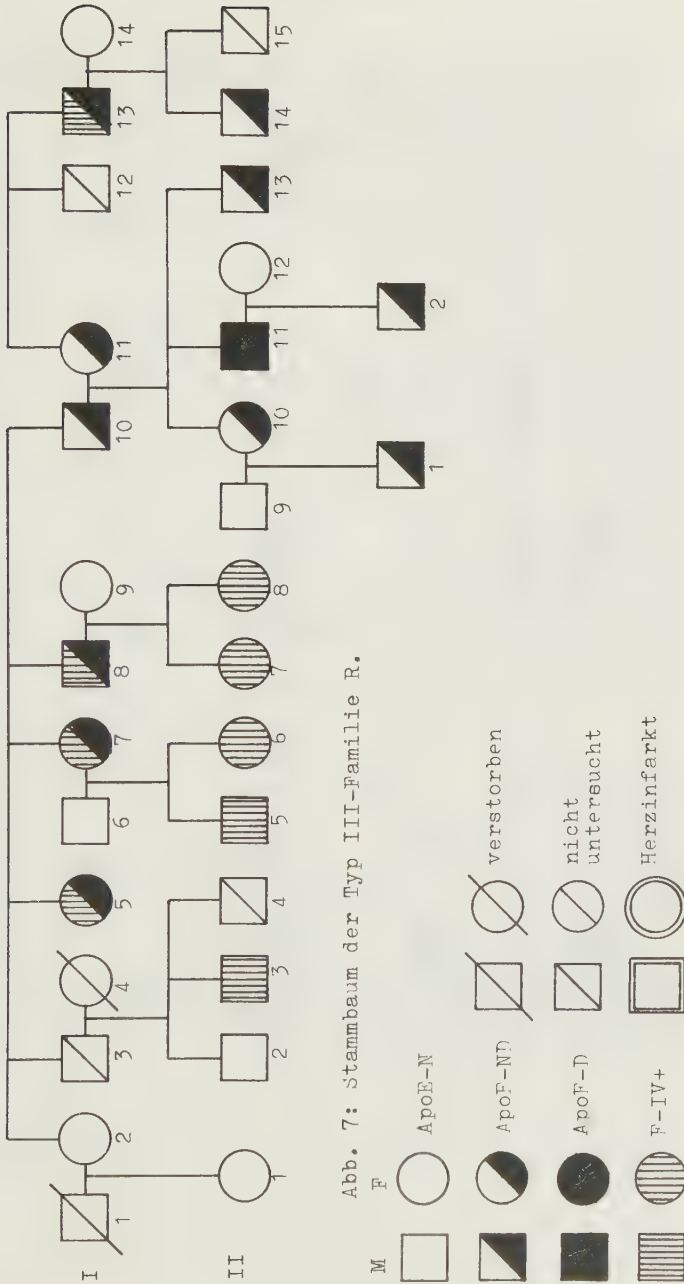
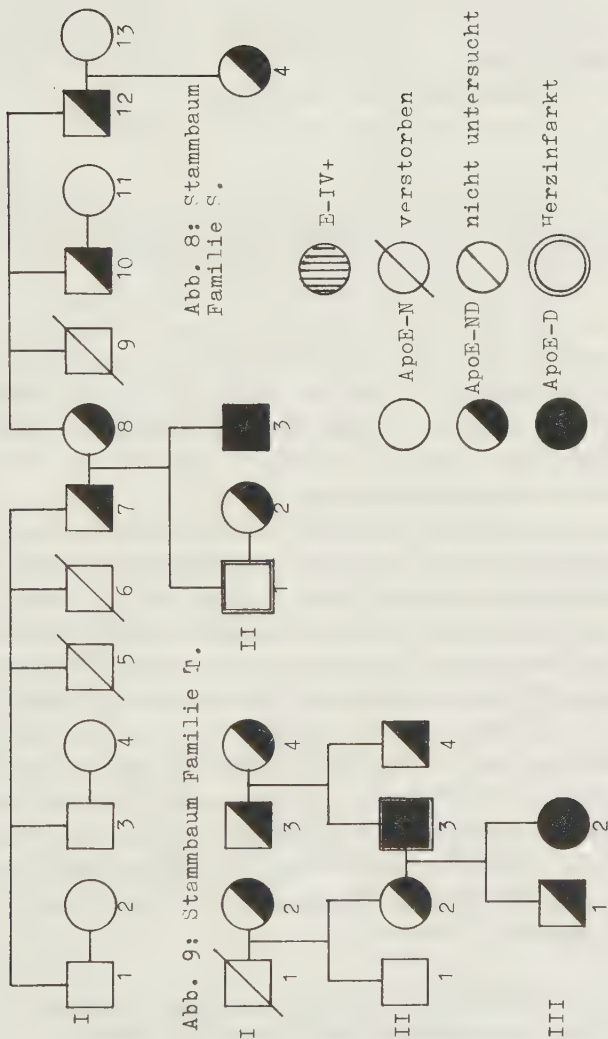


Abb. 7: Stammbaum der Typ III-Familie R.

Nr.	A/G	Lp- muster	Cholesterin			TG Ser-	C-VLDL		ApoE- muster
			Ser-	VLDL->1.006	mg/100ml		TG-VLDL	TG-Ser (r)	
I ₁	67/M	N	203			69			ApoE-N
I ₂	65/F	N	210			57			ApoE-N
I ₃	63/M	N	238			140			ApoE-N
I ₄	57/F	N	206			67			ApoE-N
I ₇	65/M	N	188			46	0.14		ApoE-ND
I ₈	63/F	N	213			101	0.22		ApoE-ND
I ₁₀	64/M	N	268	29	225	172	0.32	0.17	ApoE-ND
I ₁₁	62/F	N	281	17	252	99		0.17	ApoE-N
I ₁₂	57/M	N	238	49	168	277		0.18	ApoE-ND
I ₁₃	52/F	N	206	33	156	182		0.18	ApoE-N
II ₁	35/M	N	133			86			ApoE-N
II ₂	30/F	N	173			87			ApoE-ND
II ₃	29/M	III	176			272	0.29		ApoE-D
II ₄	26/F	N	153	28	109		0.18		ApoE-ND
I ₂	68/F	N	216	29	168	143		0.20	ApoE-ND
I ₃	74/M	N	222			90	0.32		ApoE-ND
I ₄	73/F	N	255			118	0.29		ApoE-ND
II ₁	40/M	N	218	25	178	101		0.25	ApoE-N
II ₂	45/F	N	163			79			ApoE-ND
II ₃	49/M	III	479			467	0.64	0.53	ApoE-D
II ₄	37/M	N	231			154	0.42		ApoE-ND
III ₁	19/M	N	159			78	0.26		ApoE-ND
III ₂	17/F	III	158			61	0.23		ApoE-D

Tab. VIII u. IX: Labordaten der Typ III-Familien S. (oben) und T. (unten). Die Typ III-Patienten sind A.S. (= S-II₃) und E.T. (T-II₃).



Elternkombination	Phänotyp der Kinder		
	ApoE-N	ApoE-ND	ApoE-D
ApoE- N x ApoE- N (0)	-	-	-
ApoE- N x ApoE-ND (5)	4	3	-
ApoE-ND x ApoE-ND (4)	1	4	3
ApoE- D x ApoE- N (2)	-	4	-
ApoE- D x ApoE-ND (1)	-	1	1

Tab. X: Untersuchte ApoE-Elternkombinationen und resultierende ApoE-Phänotypen der Kinder.

Bei den Kindern der Elternkombination ApoE-D x ApoE-N trat ausschließlich der intermediäre ApoE-ND-Phänotyp auf. ApoE-D und ApoE-N wurden in keinem Fall beobachtet. Dies spricht eindeutig gegen einen autosomal-dominanten Erbgang.

ApoE-D konnte nur bei einem Kind (T-III₂) eines Typ III-Probanden nachgewiesen werden. Hier lag jedoch die Elternkombination ApoE-D x ApoE-ND zugrunde.

Bei den Eltern der Typ III-Probanden wurde der Phänotyp ApoE-N in keinem Fall beobachtet; die 7 untersuchten Eltern waren dem intermediären ApoE-ND-Phänotyp zuzuordnen.

Individuen der Phänotypen ApoE-N und ApoE-ND erfüllten in keinem Fall die elektrophoretischen und lipidemischen Kriterien einer Hyperlipoproteinämie Typ III. Mit Hilfe des ApoE-D-Nachweises konnte neben T-III₂ eine weitere Broad-ß Disease bei M-III₁ (Familie M.) diagnostiziert werden.

Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß es sich bei den ApoE-ND-Fokussiermustern um den phäno-

typischen Ausdruck heterozygoter Merkmalsträger handelt, deren homozygotes Auftreten sich als Broad- β Disease manifestiert, d.h. die Broad- β Disease wird aller Wahrscheinlichkeit nach autosomal-rezessiv vererbt. Der zugrundeliegende Genotyp wird im folgenden als ApoE^d/E^d bezeichnet.

Hyperlipoproteinämien in Typ III - Familien:
Beziehungen zum ApoE-Phänotyp.

Da ausgeprägtere Hyperlipidämien im allgemeinen erst im Erwachsenenalter auftreten (22,25,31,34), werden in den folgenden Ausführungen neben den Typ III - Patienten E.M., E.R., A.S. und E.T. nur deren erwachsene Verwandte über 20 Jahre berücksichtigt.

Auffallend war das häufige Auftreten anderer Hyperlipoproteinämien in den untersuchten Typ III - Familien. Hyperlipidämien treten nach epidemiologischen Untersuchungen bei etwa 10% der Normalbevölkerung auf. In der vorliegenden Arbeit zeigten 13 von 33 erwachsenen Typ III - Verwandten (39%) eindeutig erhöhte Serumlipide. Aufgrund elektrophoretischer und lipidchemischer Kriterien konnten 9 Typ II- und 3 Typ IV-Hyperlipoproteinämien (nach FREDRICKSON) differenziert werden (Tab.XI). Proband S-I₁₂ zeigte zwar deutlich erhöhte Serumtriglyceride, ein Typ IV stellte sich jedoch elektrophoretisch nicht dar. Bei 4 Probanden lagen die Serumlipidwerte im oberen Grenzbereich (R-I₇, R-II₆, S-I₁₀, M-III₄).

Es lag nahe, die Hyperlipidämien als Ausdruck des heterozygoten Genotyps (ApoE^d/Eⁿ) anzusehen.

Typ III-Familienmitglieder über 20 Jahre	38	ApoE-N 11	ApoE-ND 22	ApoE-D 5
hyperlipämisch insgesamt	18	2	11	5
davon Typ IIa	6	1	5	-
Typ IIb	3	1	2	-
Typ III	5	-	-	5
Typ IV	3	-	3	-
nicht einzuordnen	1	-	1	-

Tab. XI: Auftretende Hyperlipoproteinämie-Typen (nach FREDRICKSON und LEES) bei erwachsenen Probanden über 20 Jahre in Typ III-Familien.

Dies wurde jedoch durch die Untersuchungen nicht bestätigt. Zum einen wurden Hyperlipidämien auch beim Phänotyp ApoE^N beobachtet; zum andern waren 50% der heterozygoten ApoEND-Probanden normolipämisch (Tab. XI). Eine eindeutige Beziehung zwischen ApoEND-Phänotyp und den in den untersuchten Typ III-Familien häufigen Hyperlipoproteinämien stellte sich somit nicht dar.

Die Aufspaltung der verschiedenen Hyperlipoproteinämie-Typen in den untersuchten Typ III-Familien ist in Tab. XII zusammengefaßt.

Eine genetisch determinierte Beziehung zwischen Broad- β Disease und anderen Hyperlipidämien läßt sich hier nicht nachweisen:

Broad- β Disease und die Hyperlipoproteinämien Typ II und IV werden offensichtlich unabhängig voneinander vererbt.

Elternkombination	Anzahl ()	Folgegeneration				
		IIa	IIb	III	IV	Normal
Normal x normal	(2)	-	-	2	-	2
Typ IIa x Typ IIa	(1)	1	1	1	-	-
Typ IIb x normal	(1)	-	-	-	-	2
Typ III x normal	(2) ⁺	1	-	1	1	2
Typ IV x normal	(1)	-	-	-	-	1

Normal = aufgrund der Serumlipide und des Elektrophoresemusters keine Hyperlipoproteinämie nachweisbar

⁺ T-III₁ (normal) und T-III₂ (Typ III) im Alter von 19 bzw. 17 Jahren hier berücksichtigt

Tab. XII: Elternkombinationen (basierend auf Elektrophoresemuster und Serumlipidwerten - unabhängig vom ApoE - Phänotyp) und resultierende Hyperlipoproteinämie - Typen der Kinder.

Inwieweit unabhängig vererbte Hyperlipoproteinämie - Gene beim Zusammentreffen mit den homozygoten Genotyp E^d/E^d in einem Individuum die Broadß Disease (mit normalen oder nur gering erhöhten Lipidwerten) im Sinne einer ausgeprägten 'Hyper'lipoproteinämie Typ III modifizieren, wird noch ausführlicher zu diskutieren sein.

Auffällig ist, daß die Typ III - Patienten A.S. und E.T. aus normolipämischen Elternkombinationen hervorgingen (Tab. XII). Die Serumlipidwerte des Typ III-Probanden A.S. der 'normolipämischen' Familie S. sind vergleichsweise niedrig. Die Normolipämie beim Vater (T-I₃) des Typ III-Patienten E.T. ist möglicherweise durch die medikamentöse Diabetestherapie bedingt (s.S.12).

ApoE-IV - Variante

Bei einigen Probanden der Familien M. und R. trat im ApoE - Fokussiermuster der harnstofflöslichen VLDL eine zusätzliche Bande auf, die als ApoE-IV bezeichnet wurde (Abb. 3,6,7). ApoE-IV trat in etwa gleicher Häufigkeit bei den Phänotypen ApoE-N und ApoE-ND auf (vgl. auch S. 16). Der Phänotyp Apo E-D/E-IV+ wurde nicht beobachtet. Die ApoE-IV - Variante wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

IV. Diskussion

Das ursprüngliche klassische Kriterium zur Diagnostik der Broad- β Disease - der Nachweis der atypischen β -VLDL in der Lipidelektrophorese - ist nach neuerer Auffassung nicht als spezifisch anzusehen (11,24). Daher wurden verschiedene Versuche unternommen, die Broad- β Disease mit Hilfe lipidchemischer Kriterien zu definieren (11,21). Diese Kriterien sind jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen anwendbar. Eine sichere Abgrenzung gegenüber anderen Hyperlipoproteinämien ist nicht immer möglich (25,34,44).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine grundlegend veränderte Apoprotein E-Komposition bei Typ III - Patienten nachgewiesen werden. Diese betraf einmal den prozentualen ApoE-Anteil an den harnstofflöslichen VLDL, zum andern das Verhältnis der ApoE-Polypeptidkomponenten untereinander.

Die beobachtete Zunahme der ApoE-Konzentration in den VLDL von Broad- β Disease - Patienten stimmt mit Ergebnissen von HAVEL und KANE überein (18), erlaubt

jedoch alleine keine sichere Abgrenzung von anderen Hyperlipoproteinämien. Neuere Untersuchungen umfangreicher hyperlipämischer Kontrollgruppen zeigen bei einigen Individuen mit endogener Hypertriglyceridämie ähnlich ansteigende ApoE-Konzentrationen im Verhältnis zum Apoprotein C in den VLDL (44).

Das entscheidende Kriterium aber, das eine Abgrenzung der Broad- β Disease von allen andern untersuchten Hyperlipoproteinämien ermöglichte, betraf das qualitative ApoE-Muster. Bei 8 zunächst untersuchten Typ III - Patienten, die eine eindeutige β -VLDL-Fraktion in der Lipidelektrophorese zeigten und zudem die oben ausgeführten lipidchemischen Kriterien erfüllten, fehlte übereinstimmend eine der polymorphen Formen des Apoprotein E: das Polypeptid ApoE-III. Eine ApoE-III-Defizienz wurde jedoch bei keiner der 49 normo- und hyperlipämischen Kontrollen beobachtet.

Die ApoE-III - Defizienz repräsentiert damit ein spezifisches qualitatives Kriterium zur Diagnostik der Broad- β Disease auf Proteinebene.

Der primäre Defekt der Broad- β Disease ist nicht bekannt, ebensowenig die biologische Funktion des Apoproteins E und seiner polymorphen Formen. Möglicherweise durch das Fehlen des ApoE-III-Polypeptids bedingte Störungen im Lipoprotein-Metabolismus sind somit nicht nachzuweisen.

Neuere Untersuchungen und theoretische Überlegungen weisen jedoch indirekt auf eine zentrale Bedeutung der ApoE-III-Defizienz im pathophysiologischen Geschehen der Broad- β Disease hin (44).

Nach allgemeiner Auffassung werden die triglyceridreichen prä- β -VLDL beim normalen Individuum in einem kontinuierlichen Prozeß zu LDL katabolisiert (4,24). Dabei kommt es zunächst zur Triglyceridabspaltung durch die Lipoproteinlipase im Kapillarendothel des extrahepatischen Gewebes und zur Übertragung der C-Apoproteine auf die HDL. Die entstehenden intermediären Lipoproteine ("remnants") werden normalerweise schnell zu LDL₂ katabolisiert, wobei eine Beteiligung der Leberlipase diskutiert wird (44).

Bei der Broad- β Disease kommt es nun aufgrund einer Blockade des normalen VLDL-Katabolismus zur unphysiologischen Anhäufung der intermediären "remnants". Diese sind charakterisiert durch einen höheren Cholesteringehalt, verminderte Triglyceridkonzentration, langsamere elektrophoretische Mobilität und eine niedrigere Flotationskonstante (S_f 12-60) als ihre Vorläufer, die prä- β -VLDL (19,24,44).

Zudem war bei den hier untersuchten Typ III - Patienten der Apoprotein C - Gehalt der harnstofflöslichen VLDL vergleichsweise niedrig (Tab.V). Die Blockade des normalen VLDL-Abbauweges ist demnach nach der initialen Lipoproteinlipase-Einwirkung und nach Verlust der C-Gruppen-Proteine anzunehmen. Anzumerken ist, daß Leberlipase und extrahepatische Lipoprotein-Lipase nach Untersuchungen GRETEN's beim Typ III in normaler Konzentration vorliegen, d.h. der blockierte VLDL-Katabolismus kann nicht als Folge einer verminderten Lipase-Aktivität angesehen werden (16).

Nach HAZZARD und BIERMAN ist die Lipidkomposition der neu synthetisierten VLDL bei der Broad- β Disease völlig normal, die abnorme β -VLDL entsteht erst als Folge des blockierten VLDL-Katabolismus (24).

Neuere Untersuchungen zeigen, daß die ApoE- III-Defizienz unabhängig von der relativen Proportion der β - und prä- β - VLDL auftritt.

Nach Trennung beider Komponenten konnte die ApoE-III-Defizienz bereits bei den prä- β - VLDL nachgewiesen werden. Die veränderte ApoE- Komposition ist demnach nicht als Folge des gestörten VLDL- Abbaus anzusehen (44).

Einen indirekten Hinweis auf die zentrale Bedeutung der ApoE- III- Defizienz im pathophysiologischen Geschehen der Broad- β Disease liefern auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Typ III - Familienuntersuchungen. Diese zeigen, daß das ApoE-Muster direkt unter genetischer Kontrolle steht.

Die Frage, wie die veränderte ApoE- Polypeptidkomposition beim Typ III auf den VLDL- Metabolismus einwirkt, kann hier nicht beantwortet werden.

Die oben ausgeführten Beobachtungen können jedoch als indirekte Hinweise dafür angesehen werden, daß die ApoE-III-Defizienz dem primären Defekt der Broad- β Disease nahesteht.

Der Vererbungsmodus der Broad- β Disease war bisher umstritten (10,25,31,32,33).

Auffallend war die Häufigkeit anderer Hyperlipidämien in Typ III - Familien (25,28,31).

MORGANROTH beobachtete bei der Lipoproteinanalyse von 107 erwachsenen Typ III - Verwandten bei 46% erhöhte Serumlipide. Er nahm an, daß die Broad- β Disease möglicherweise Resultat des Zusammenwirkens zweier für andere Hyperlipoproteinämieformen spe-

zifischer Merkmalsträger in einem Individuum ist, d.h. Resultat eines gemischt-heterozygoten Erbgangs (31).

MATTHEWS (28) suchte das häufige Auftreten anderer Hyperlipoproteinämien in Typ III - Familien durch die Hypothese einer gemeinsamen genetisch determinierten Störung zu erklären, deren unterschiedliche Ausprägung Typ III oder Typ IV repräsentiert.

Die Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III beruhte bei von HAZZARD durchgeführten Typ III - Familienuntersuchungen an 107 Probanden auf dem Nachweis der atypischen β -VLDL. Die oben aufgeführte Elternkombination ApoE-D x ApoE-ND wäre hier aufgrund des Lipoproteinmusters als Typ III x Normal zu kennzeichnen. Diese Kombination trat bei HAZZARD's Untersuchungen in Generation II 4mal auf. Daraus resultierte bei 7 der 16 untersuchten Probanden der III. Generation wiederum die Hyperlipoproteinämie Typ III. HAZZARD postulierte aufgrund der beobachteten vertikalen Übertragung einen autosomal-dominanten Erbgang (25).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein autosomal-rezessiver Erbgang der Broad- β Disease wahrscheinlich gemacht werden, wobei die Typ III-Probanden den homozygoten Phänotyp ApoE-D eines genetisch determinierten ApoE-Polymorphismus repräsentieren.

Eine vertikale Übertragung wurde auch hier beobachtet. Bei einem Kind des Typ III-Patienten E.T. konnte die Broad- β Disease diagnostiziert werden.

Dem ApoE-D-Phänotyp lag hier die Elternkombination ApoE-D x ApoE-ND zugrunde. Bei den Kindern der Eltern-

kombination ApoE-D x ApoE-N trat ausschließlich der heterozygote ApoE-ND-Phänotyp auf, was eindeutig gegen einen autosomal-dominanten Erbgang spricht. Die Elternkombination ApoE-D x ApoE-ND läßt bei autosomal-rezessivem Erbgang bei 50% der Kinder Phänotyp ApoE-D, d.h. die Broad- β Disease, erwarten. Die auftretende vertikale Übertragung ist somit als Pseudodominanz aufzufassen.

39% der erwachsenen Typ III - Verwandten zeigten erhöhte Serumlipide.

Eine genetisch determinierte Beziehung anderer Hyperlipidämien zum ApoE-Phänotyp stellte sich in der vorliegenden Untersuchung nicht dar:

Broad- β Disease und die hier auftretenden Hyperlipoproteinämien Typ II und IV werden unabhängig voneinander vererbt. Verantwortlich für das Auftreten der Broad- β Disease ist allein der homozygote Genotyp ApoE^d/E^d.

Nun sind Typ III - Patienten beschrieben worden, deren Serumlipide im Normbereich liegen (25,44).

Das Beispiel der normolipämischen Broad- β Disease-Patientin T-III₂ (Tab. IX) bestätigt, daß ausgeprägtere Hyperlipoproteinämien vor allem mit zunehmendem Alter zu beobachten sind.

Möglicherweise sind aber unabhängig vererbte Hyperlipoproteingene beim Zusammenwirken mit dem homozygoten Genotyp ApoE^d/E^d in einem Individuum für eine Modifikation der - nur gering hyper- oder gar normolipämischen - Broad- β Disease im Sinne einer ausgeprägten Hyperlipoproteinämie Typ III verantwortlich.

Pathophysiologische Beobachtungen scheinen diese Annahme zu unterstützen:

Die beim Typ III auftretenden β -VLDL werden - wie oben ausgeführt - als physiologische "remnants" des normalen Plasmalipoproteinkatabolismus aufgefaßt, deren unphysiologische Anhäufung sie für qualitative Nachweismethoden erst faßbar macht (23,24). Einige Formen der familiären Hypertriglyceridämie und familiär kombinierten Hyperlipidämie führen nun zu ansteigender VLDL-Produktion (5,25). Sie könnten damit - wie übrigens auch chronischer Alkoholismus und Gewichtszunahme - für die verstärkte Ausprägung dieses metabolischen Defekts, d.h. für hohe Konzentrationen von β - ("remnants") und prä- β -VLDL, die schwere hyperlipämische Formen der Broad- β Disease kennzeichnen, verantwortlich sein (25).

In Anbetracht der relativen Seltenheit familiärer Hyperlipoproteinämien erscheint das Zusammenwirken des homozygoten Typ III - Genotyps mit unabhängigen Hyperlipoproteinämie - Genen in einem Individuum abwegig.

Nun ist zu bedenken, daß das klassische Kriterium zur Diagnostik der Broad- β Disease eben auf dem β -VLDL-Nachweis in der Elektrophorese beruhte. Möglicherweise werden mit Hilfe des β -VLDL-Nachweises nur solche Formen der Broad- β Disease erfaßt, die mit ansteigender VLDL-Produktion einhergehen. Als Modifikatoren der Broad- β Disease im Sinne der verstärkten Ausprägung des metabolischen Defekts könnten möglicherweise neben den oben angeführten Hyperlipoproteinämieformen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder exogene Faktoren wie chronischer Alkoholismus und Gewichtszunahme eine Rolle spielen.

Die Beantwortung der Frage einer möglichen Modifikation der Broad- β Disease durch endogene und auch exogene Faktoren wird Aufgabe weiterer Untersuchungen sein. Zwar sind die Serumlipide des Typ III - Probanden A.S. der normolipämischen Familie S. vergleichsweise niedrig (HS-C - 176 mg/100 ml, HS-TG - 272 mg/100 ml), doch kann hierfür die beim Typ III ausgesprochen wirksame diätetische Therapie wie auch das niedrige Alter verantwortlich sein.

Die klinische Anwendung des ApoE-"markers" wird vor allem den Fällen zugutekommen, die eine eindeutige Diagnose der Broad- β Disease aufgrund elektrophoretischer und lipidchemischer Kriterien nicht erlauben. Die exakte Diagnostik der Hyperlipoproteinämie - Typen ist im Hinblick auf die verschiedenartigen therapeutischen Konsequenzen unumgänglich (26). Das gilt vor allem für die Broad- β Disease, die besonders gut auf medikamentöse oder diätetische Therapie anspricht (26,31,47).

Eine vereinfachte Methode, die eine Darstellung des ApoE-Phänotyps ohne Ultrazentrifugation ermöglicht, wird zur Zeit erarbeitet.

C) Z u s a m m e n f a s s u n g

Die diagnostischen Kriterien der Hyperlipoproteinämie Typ III haben in den letzten Jahren wiederholt Abwandlungen erfahren, was die Schwierigkeiten der Abgrenzung gegenüber anderen Hyperlipoproteinämieformen aufzeigt.

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, ein spezifisches qualitatives Kriterium auf Proteinebene zur Diagnostik der Broad- β Disease zu entwickeln.

Bei 8 Typ III - Patienten, die die 'klassischen' elektrophoretischen und lipidchemischen Kriterien erfüllten, fehlte übereinstimmend eine der polymorphen Formen des Apoproteins E - das ApoE_{III}-Polypeptid - in der analytischen isoelektrischen Fokussierung, das bei allen 49 normo- und hyperlipämischen Kontrollseren nachzuweisen war. Der Phänotyp in der analytischen Fokussierung wurde als ApoE-D bezeichnet.

Zwei weitere Broad- β Disease - Probanden konnten aufgrund der ApoE_{III}-Defizienz in sich anschließenden Familienuntersuchungen diagnostiziert werden.

Bei diesen Typ III - Familienuntersuchungen an weiteren 60 Probanden konnte ein autosomal-rezessiver Erbgang der Broad- β Disease wahrscheinlich gemacht werden.

Auffallend war das häufige Auftreten anderer Hyperlipämieformen in Typ III - Familien. Ein Zusammenhang zwischen ApoE-Phänotyp und anderen Hyperlipidämien stellte sich nicht dar:

Broad- β Disease und andere Hyperlipoproteinämie-Typen werden unabhängig voneinander vererbt.

Möglicherweise sind aber Hyperlipoproteinämie-Gene, die mit dem homozygoten Genotyp der Broad- β Disease in einem Individuum zusammenwirken, für eine Modifikation dieser Erkrankung im Sinne einer ausgeprägten Hyperlipoproteinämie Typ III verantwortlich.

D) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) ALAUPOVIC, P.: Apolipoproteins and lipoproteins. Atherosclerosis 13, 141-146, 1971
- 2) BEA MONT, J.L., CARLSON, L.A., COOPER, G.R., FEJFAR, Z., FREDRICKSON, D.S., STRASSER, T.: Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. Bull WHO 43, 891-915, 1970
- 3) BILHEIMER, D.W., EISENBERG, S., LEVY, R.I.: Abnormal metabolism of very low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia (type III). Circulation 44, II-56 (Abstract), 1971
- 4) BILHEIMER, D.W., EISENBERG, S., LEVY, R.I.: The metabolism of very low density lipoproteins. I. Preliminary in vitro and in vivo observations. Biochim biophys Acta 260, 212-231, 1972
- 5) BORRIE, P.: Type III hyperlipoproteinemia. Brit med J 2, 665-667, 1969
- 6) BRUNZELL, J.D., HAZZARD, W.R., PORTE, D.J., et al.: Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism chylomicrons and very low density lipoproteins in man. J Clin Invest 52, 1578-1585, 1973
- 7) EGGSTEIN, M., KREUTZ, F.H.: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. Klin Wschr 44, 262, 1966
- 8) FREDRICKSON, D.S., LEES, R.S.: A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. Circulation 31, 321, 1965
- 9) FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., LEES, R.S.: Fat transport in lipoproteins - an integrated approach to mechanisms and disorders. New Engl J Med 276, 32-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281, 1967

- 10) FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I.: Familial hyperlipoproteinemia. In: STANBURY, J.B., WYNGARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.S. (Ed.): The metabolic Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, 595-614, 1972
- 11) FREDRICKSON, D.S., MORGANROTH, J., LEVY, R.I.: Type III hyperlipoproteinemia: an analysis of two contemporary definitions. Ann Int Med 82, 150-157, 1975
- 12) GOFMAN, J.W., DE LALLA, O., GLAZIER, F., et al.: The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery disease. Plasma (Milan) 2, 413, 1954
- 13) GOLDSTEIN, J.L., HAZZARD, W.R., SCHROTT, H.G., et al.: Genetics of hyperlipidemia in coronary heart disease. Trans Assoc Amer Phys 85, 120-138, 1972
- 14) GOLDSTEIN, J.L., HAZZARD, W.R., SCHROTT, H.G., et al.: Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. J Clin Invest 52, 1533-1543, 1973
- 15) GOLDSTEIN, J.L., SCHROTT, H.G., HAZZARD, W.R., et al.: Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder combined hyperlipidemia. J Clin Invest 52, 1544-1568, 1973
- 16) GRETEN, H., DEGRELLA, R., KLOSE, G., et al.: Measurement of two plasma triglyceride lipases by an immunochemical method: studies in patients with hypertriglyceridemia. J Lipid Res 17, 203-210, 1976
- 17) HAVEL, R.J., EDER, H.A., BRAGDON, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 34, 1345-1353, 1955

- 18) HAVEL, R.J., KANE, J.P.: Primary dysbetalipoproteinemia: Predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins. Proc Nat Acad Sci USA 70, 2015-2019, 1973
- 19) HAZZARD, W.R., LINDGREN, F.T., BIERMAN, E.L.: Very low density lipoprotein subfractions in a subject with broad-beta Disease and a subject with endogenous lipemia (type IV). Chemical composition and electrophoretic mobility. Biochim Biophys Acta 202, 517, 1970
- 20) HAZZARD, W.R., PORTE, D., BIERMAN, E.L.: Abnormal lipid composition of chylomicrons in broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia). J Clin Invest 49, 1853, 1970
- 21) HAZZARD, W.R., PORTE, D., BIERMAN, E.L.: Abnormal lipid composition of very low density lipoproteins in diagnosis of broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia). Metabolism 21, 1009-1019, 1972
- 22) HAZZARD, W.R., GOLDSTEIN, J.L., SCHROTT, H.G., et al.: Hyperlipidemia in coronary heart disease. III. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction. J Clin Invest 52, 1569-1577, 1973
- 23) HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L.: Broad- β disease versus endogenous hypertroglyceridemia: Levels and lipid composition of chylomicrons and very low density lipoproteins during fat-free feeding and alimentary lipemia. Metabolism 24, 817-828, 1975
- 24) HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L.: The spectrum of electrophoretic mobility of very low density lipoproteins: role of slower migrating species in endogenous hypertriglyceridemia (type IV hyperlipoproteinemia) and broad- β disease (type III). J Lab Clin Med 80, 2, 239-252, 1975

- 25) HAZZARD, W.R., O'DONELL, T.F., LEE, Y.L.:
Broad- β disease (type III hyperlipoproteinemia)
in a large kindred. Evidence for a monogenic
mechanism. *Ann Int Med* 82, 141-149, 1975
- 26) LEVY, R.I., et al.: Dietary and drug treatment
of primary hyperlipoproteinemia.
Ann Int Med 77, 267-294, 1972
- 27) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L.,
RANDALL, R.I.: Protein measurement with the
folin phenol reagent.
J Biol Chem 193, 265-275, 1951
- 28) MATTHEWS, R.J.: Type III und type IV familial
hyperlipoproteinemia.
Am J Med 44, 188-199, 1968
- 29) VAN MELSEN, A., DE GREVE, Y., VANDERVEIKEN, F.,
VASTESAEGER, M., BLATON, V., PEETERS, H.:
A modified method for phenotyping of hyperlipo-
proteinemia on agarose gel electrophoresis.
Clin Chim Acta 55, 225-234, 1974
- 30) MISHKEL, M.A.: Type III hyperlipoproteinemia
with xanthomasis. In: PEETERS, H. (Ed.):
Protides of the biological fluids, Pergamon
Press, New York, 283-287, 1971
- 31) MORGANROTH, J., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S.:
The biochemical, clinical, and genetic features
of type III hyperlipoproteinemia.
Ann Int Med 82, 158-174, 1975
- 32) MOSER, H., SLACK, J., BORRIE, P.: Type III hyper-
lipoproteinemia: a genetic study with an account
of the risks of coronary death in first degree
relatives (Abstract 125). III International
Symposium on Artherosclerosis, West Berlin,
Germany, Oktober 24-28, 1973

- 33) O'DONELL, T.F., LUM, Y.L., HAZZARD, W.R.:
Type III hyperlipoproteinemia: 1 or 2 disorders?
- The genetic approach (Abstract).
Clin Res 21, 218, 1973
- 34) PATSCH, J.R., PATSCH, W., SAILER, S., BRAUN-
STEINER, H.: Familiäre Hyperlipoproteinämie
Typ III. Dtsch med Wschr 101, 1612-1619, 1976
- 35) QUARFORDT, S., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S.:
On the lipoprotein abnormality in type III
hyperlipoproteinemia.
J Clin Invest 50, 754-761, 1972
- 36) ROESCHLAU, P.: Enzymatische Bestimmung des
Gesamt-Cholesterins im Serum.
Z Klin Chem Klin Biochem 12, 226, 1974
- 37) SHELburnE, F.A., QUARFORDT, S.H.: A new apopro-
tein of human plasma very low density lipopro-
teins. J Biol Chem 249, 1428, 1974
- 38) SHORE, V.G., SHORE, B.: Heterogeneity of human
plasma very low density lipoproteins. Separation
of species differing in protein component.
Biochemistry 12, 502-507, 1973
- 39) SHORE, V.G., SHORE, B., HART, R.G.: Changes in
apolipoproteins and properties of rabbit very
low density lipoproteins on induction of choleste-
remia. Biochemistry 13, 1579-1585, 1974
- 40) SLACK, J., MILLS, G.L.: Lipoprotein abnormalities
associated with type III hyperlipoproteinemia.
In: SCHETTLER, G., WEIZEL, A. (Ed.): Atheroscle-
rosis III Springer, New York - Heidelberg -
Berlin, 682, 1974
- 41) UTERMANN, G.: Isolation and partial characte-
rization of an arginine-rich apolipoprotein from
human plasma very-low-density lipoproteins: Apo-
lipoprotein E. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 356,
1113-1121, 1975

- 42) UTERMANN, G., JÄSCHKE, M., MENZEL, J.:
Familial hyperlipoproteinemia type III: Deficiency of a specific apolipoprotein (ApoE-III) in the very low density lipoproteins.
FEBS Letters 56, 352-355, 1975

- 43) UTERMANN, G., MENZEL, H.J., SCHOENBORN, W.:
Plasma lipoprotein abnormalities in a case of primary high-density lipoprotein (HDL) deficiency.
Clin Genet 8, 258-268, 1975

- 44) UTERMANN, G., CANZLER, H., HEES, M., JÄSCHKE, M.,
MÜHLFELLNER, G., SCHOENBORN, W., VOGELBERG, K.H.:
Studies on the metabolic defect in broad- β disease (Hyperlipoproteinemia type III).
Im Druck.

- 45) WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J Biol Chem 244, 4406-4412, 1969

- 46) WRIGLEY, C.
Sci Tools 15, 17, 1968

- 47) ZELIS, R., MASON, D.T., BRAUNWALD, E., LEVY, R.I.:
Effects of Hyperlipoproteinemias and their treatment on the peripheral circulation.
J Clin Invest 49, 1007-1015, 1970

Lebenslauf

Am 9.4.1950 wurde ich als Sohn des Pfarrers Hans-Werner Jaeschke und seiner Ehefrau Johanna geb. Hensel in Darmstadt geboren.

Von 1956 - 1960 besuchte ich die Grundschule und anschließend das humanistische Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt. Im Februar 1962 verlegten meine Eltern ihren Wohnsitz nach Schwalmstadt-Treysa, wo ich bis zum Abitur 1968 die Melanchthonschule Steinatal besuchte.

Nach 2 Semestern Studium der Theologie (WS 68/69, SS 69) und einem 6-monatigen Krankenpflegepraktikum an der Universitätsklinik in Marburg erhielt ich zum SS 1970 einen Studienplatz im Fach Humanmedizin. Nach 2 Semestern bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, nach 5 Semestern die ärztliche Vorprüfung. Im Oktober 1974 begann ich mit meiner Dissertation am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg. Das Staatsexamen bestand ich am 21.10.1976.

Vom 1. Januar bis 31. Juli 1977 war ich als Medizinalassistent in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Wittmund tätig.

Zur Zeit arbeite ich im Bremer Zentralkrankenhaus "Links der Weser".

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

Amon, Aurich, Braasch, Buchholz, Castenholz, Daume,
Dehnicke, Dimroth, Dombrowski, Exner, Friedrich,
Grau, Golenhofen, Haberich, Hamelmann, Hardewig,
Havemann, Hensel, Hess, Hilgermann, Hort, Huch,
Jacob, Kaffarnik, Klaus, Karlson, Koecke, Koransky,
Lauer, Maroske, Martini, Nultsch, Petry, Pots,
Richter, Riecken, Rodeck, Rohen, Schmitz-Moormann,
Schneider, Siegert, Straub, Uhlarik, Walcher, Wehr-
meyer, Wesemann, Wiegandt.

